

بررسی اثر لیزر کم توان Ga-Al-As بر زیست‌سازگاری و زیست‌فعالی داربست کامپوزیتی PLGA-PEG-Hydroxyapatite

خلاصه

مقدمه: داربست‌های زیست‌تخریب‌پذیر به همراه بیوسرامیک‌ها زیست‌سازگاری بسیار خوبی را در بسیاری از کاربردهای مهندسی بافت از خود نشان داده‌اند و توانسته‌اند رشد سلول‌ها و همچنین سازمان‌یابی سه‌بعدی شبه‌بافتی آن‌ها را سبب گردند، انتظار می‌رود لیزرهای کم‌توان بتوانند این روند را بهبود بخشند.

روش بررسی: در این مطالعه اثر لیزر کم‌توان Ga-Al-As با طول‌موج ۸۳۰ نانومتر (و توان خروجی ۴۰۰ mW) از فاصله یک سانتی‌متری به مدت ۱۰۰ ثانیه در روز بر زیست‌سازگاری و زیست‌فعالی داربست کامپوزیتی PLGA-PEG-Hydroxyapatite در روزهای ۷ و ۱۴ بررسی شده است.

یافته‌ها: بر مبنای نتایج به‌ترتیب بلور هیدروکسی‌آپاتیت نسبت به کامپوزیت و کوپلیمر، زیست‌سازگاری بیشتری دارند و این میزان طی زمان افزایش می‌یابد. لیزر بر زیست‌سازگاری هیدروکسی‌آپاتیت در هر دوزمان اندازه‌گیری معنی‌دار است و باعث افزایش آن می‌شود ولی این اثر بر کوپلیمر مورد آزمایش به‌طور کلی معنی‌دار نیست. تابش لیزر در کامپوزیت باعث افزایش اندک و معنی‌دار زیست‌سازگاری می‌گردد همچنین به‌ترتیب بلور هیدروکسی‌آپاتیت نسبت به کامپوزیت و کوپلیمر زیست‌فعالی یا بیواکتیویته بیشتری دارند و باعث افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز می‌شوند و این میزان طی زمان افزایش می‌یابد هر دوی این روندها دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند. اما، اثر لیزر بر زیست‌فعالی یا بیواکتیویته هیدروکسی‌آپاتیت در هر دوزمان اندازه‌گیری معنی‌دار نیست و باعث افزایش آن نمی‌شود این اثر بر کوپلیمر مورد آزمایش نیز به‌طور کلی معنی‌دار نیست. در خصوص کامپوزیت هم می‌توان گفت که تابش لیزر باعث افزایش اندک زیست‌فعالی در روز چهاردهم می‌گردد ولی این تغییر مختصر معنی‌دار نمی‌باشد. بررسی اثر لیزر به‌تنهایی نیز بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در افزایش بقاء و بیواکتیویته سلول‌ها و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در گروه تابش لیزر می‌باشد.

نتیجه‌گیری: تابش دوز و طول‌موج لیزر مورد آزمون در این مطالعه می‌تواند موجب بهبود زیست‌سازگاری هیدروکسی‌آپاتیت و کامپوزیت شود ولی بر کوپلیمر بی‌اثر است. همچنین این تابش بر بیواکتیویته و میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز سلول‌ها در مجاورت مواد مورد آزمون بی‌تأثیر بوده است.

واژه‌های کلیدی: لیزر کم‌توان، زیست‌سازگاری، زیست‌فعالی، داربست‌های زیست‌تخریب‌پذیر

سیما شهابی^{۱،۴}
نسیم چینی‌فروش^۲
علی داودی^۱
مریم جهانگیری مقدم^۴
بتول کریمی^۴
سید مصطفی فاطمی^{۴،۳}

۱. گروه مواد دندان‌دانی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران ایران
۲. مرکز تحقیقات لیزر در دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران ایران
۳. گروه مواد دندان‌دانی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران ایران
۴. گروه پژوهشی لیزر پزشکی، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تهران ایران

مقدمه

انجام شده‌اند در حالی که محیط کشت سه‌بعدی به وضعیت سلول‌ها در ماتریکس خارج سلولی نزدیک‌تر است [۲۰]. به همین منظور ایجاد داربست‌های متخلخل مصنوعی و طبیعی در محیط‌های آزمایشگاهی مورد توجه قرار گرفته است [۲۱]. گزارش شده است که لیزر هلیوم-نئو نمی‌تواند باعث تکثیر سلول‌های شوان موش شود [۳۲]. همچنین اثرباش لیزر در تکثیر فیبروبلاست‌های لته گزارش شده است [۳۳]. در اغلب مطالعات مهندسی بافت استخوان، فاکتورهایی مانند اسید آسکوربیک، گلیسروفسفات، ویتامین D_۳ و BMPs جهت القاء تمایز سلول‌های بنیادی به استئوبلاست مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۳۴-۳۶]. اما، Gottlieb و همکاران نشان دادند که با وجود عدم حضور فاکتورهای القاء‌کننده در محیط کشت، تابش اشعه لیزر می‌تواند منجر به تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان به سلول‌های استئوبلاست شود [۳۷].

هدف از تحقیق حاضر، بررسی اثر لیزر کم توان بر زیست‌سازگاری (بقای سلولی، آزمون MTT) و زیست‌فعالیت (فعالیت آنزیم ALP) داربست کامپوزیتی حاوی PLGA-PEG-Hydroxyapatite می‌باشد. فرض بر این است که این داربست توانایی القای استخوان‌سازی در نقایص استخوانی را خواهند داشت.

روش بررسی

مواد

هیدروکسی‌آپاتیت

رسوب هیدروکسی‌آپاتیت در محلول مائی آمونیوم‌هیدروژن فسفات و نیترات کلسیم در حضور فعال‌کننده سطحی غیر یونی (الکل و اسید چرب اتوکسیله شده) به عنوان سورفاکتانت در محیط قلبیایی شده توسط آمونیاک با pH=10.5 و در دما و فشار تعادلی تشکیل گردید، این ترکیب در کوره تحت خلأ ۲ بار، در دمای ۶۵۰ درجه به مدت یک ساعت حرارت دید تا مواد زائد آن حذف شود و تخلخل لازم را بیابد. جهت تأیید تشکیل بلورهای هیدروکسی‌آپاتیت و آنالیز ساختاری آن از XRD و برای آنالیز ابعادی از SEM استفاده گردید. (شکل ۱)

اندازه بلورهای هیدروکسی‌آپاتیت در این روش ۵۰ تا ۲۰۰ نانومتر در SEM و اندازه کریستالیت‌های آن بر مبنای معادله دبای شرر از روی طیف XRD، ۱۹ نانومتر محاسبه گردید.

زنجیره‌های کopolymerی

ترکیب زنجیره‌های مورد نظر کopolymer پلی‌لاکتیک، گلایکولیک-اسید-پلی‌اتیلن گلایکول PLGA-PEG-PLGA بوده است که در PLGA نسبت لاکتیک-اسید به گلایکولیک-اسید ۷۵ درصد به ۲۵ درصد بود و PEG در وزن ۲۰۰۰ دالتون مورد استفاده قرار گرفت که ۵ درصد کل کopolymer را تشکیل داد.

داربست‌های زیست‌تخریب‌پذیر و از آن جمله، کopolymerهای پلی‌لاکتیک-اسید-پلی‌گلیکولیک-اسید (PLGA)، پلی‌اتیلن گلایکول PEG به همراه بیوسرامیک‌ها یکی از پلیمرهای مصنوعی است که به عنوان داربست مورد استفاده قرار می‌گیرد و زیست‌سازگاری بسیار خوبی را در بسیاری از کاربردهای مهندسی بافت از خود نشان داده‌است، این داربست‌ها رشد سلول‌های بنیادی جنینی و همچنین سازمان‌یابی سه‌بعدی شبه‌بافتی آن‌ها را سبب می‌گردند. با استفاده از این داربست‌های قابل تخریب علاوه بر اینکه یک بستر ساختاری مکانیکی ضروری برای کنترل رشد سلول‌های بنیادی جنینی ایجاد می‌شود [۴-۱]، انتقال کارآمد مواد غذایی و دیگر فاکتورهای رشد نیز صورت می‌گیرد. هنگامی که سلول‌های بنیادی جنینی یک ساختار بافتی سه‌بعدی را شکل می‌دهند [۶-۴]، داربست به صورت تدریجی تخریب می‌شود و تنها سلول‌های تمایز یافته باقی می‌مانند. در چنین سیستمی با استفاده از سیگنال‌های رشد مناسب، تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به انواع زیادی از بافت‌های گوناگون بدون تغییر مواد ماتریکس اولیه امکان‌پذیر می‌گردد. خصوصیات فیزیکی ساختار داربست مانند اندازه منافذ و ترکیب پلیمر به طور معنی‌داری تمایز سلول‌های بنیادی را تحت تأثیر قرار می‌دهد و مثلاً میزان تخلخل داربست کمتر از ۹۰ درصد با اندازه منافذ کمتر از ۱۵۰ میکرومتر با تمایز به سمت لاین سلولی هماتوپوئیتیک نسبت معکوس دارد [۹-۶]. اگرچه مواد زیستی مصنوعی دارای مزایای مهمی از قبیل قابلیت تنظیم خصوصیات مکانیکی، سرعت تخریب و میزان تخلخل می‌باشند، اما دارای معایبی از قبیل زیست‌فعال بودن ذاتی اندک در PEG و تولید محصولات اسیدی در PLGA نیز هستند. تغییر مواد مصنوعی با ترکیبات زیستی شیمیایی و بیولوژیکی می‌تواند باعث ایجاد پاسخ‌های سلولی مناسب گردد. خصوصیات فیزیکی این پلیمرها با تغییر نسبت اسیدلاکتیک به اسیدگلیکولیک، وزن مولکولی و میزان کریستاله‌شدن قابل تغییر می‌باشد [۲۲ و ۲۳].

امروزه، مشخص شده است که تابش لیزر می‌تواند باعث درمان بعضی از بیماری‌ها، کنترل التهاب و بهبود زخم‌ها، سنتز کلاژن و بازسازی عصب شود [۱۴-۱۰]. مکانیسم اثر لیزر کم توان بر روی فعالیت سلول‌ها توسط Karu و همکاران تشریح شده است [۱۵ و ۱۶]. همچنین مطالعات نشان داده است که تابش اشعه لیزر می‌تواند باعث تحریک استخوان‌سازی شود [۱۹-۱۷]. تا کنون تحقیقات متعددی اثر لیزر کم توان را در تشکیل استخوان به صورت *In vivo* و *In vitro* نشان داده‌اند [۲۸-۲۴].

مطالعات نشان داده است که لیزر کم توان می‌تواند باعث تکثیر و بالغ شدن استئوبلاست‌های انسانی در محیط *In vitro* شود [۲۹]. همچنین اثر لیزر در افزایش تکثیر لنفوسیت‌ها و کندروسیت‌ها گزارش شده است [۳۰ و ۳۱]. اغلب مطالعاتی که تاکنون اثر لیزر را بر سلول‌های بنیادی مورد بررسی قرار داده‌اند، در محیط کشت دو بعدی

حذف حلال قرار گرفتند.

کل نمونه‌ها (هیدروکسی‌آپاتیت، کوپلیمر و کامپوزیت) در دو گروه با تابش لیزر و بدون تابش لیزر قرار گرفتند و تحت آزمون‌های زیست‌سازگاری و زیست‌فعالی قرار داده شدند. جهت بررسی اثر لیزر به‌تنهایی نیز یک گروه سلولی بدون مجاورت با مواد سازنده داربست تنها تحت تابش لیزر قرار گرفت.

تیمار و آزمون‌ها

لیزرتابی

لیزرتابی چاهک‌ها با استفاده از لیزر دیود (Ga-Al-As) با طول موج ۸۳۰ نانومتر (و توان خروجی ۴۰۰ mW) از فاصله یک‌سانتری متری به مدت ۱۰۰ ثانیه در روز انجام شد. جهت جلوگیری از تابش به چاهک‌های دیگر در پلیت‌های لیزر حداقل دو خانه خالی از هر طرف فاصله قرار داده شد و در ضمن از مقوای تیره با یک سوراخ به اندازه سر چاهک برای ورود نوک پروب لیزر استفاده گردید.

آزمون زیست‌سازگاری MTT

در این آزمون که برای سنجش بقاء سلول‌ها در مجاورت ماده به کار می‌رود، از سلول‌های فیبروبلاست L۹۲۹ استفاده گردید و تست زیست‌سازگاری در روزهای ۷ و ۱۴ انجام شد.

پس از کشت اولیه سلول‌ها و پاساژ دوم، برای هر روز آزمون و هر گروه اصلی تابش لیزر و کنترل در چاهک‌های یک پلیت ۹۶ خانه ۲۰۰۰۰ هزار عدد سلول در ۱۰۰ میکرولیتر محیط DMEM کشت داده شدند. (هر گروه ۵ چاهک) پس از ۲۴ ساعت ۵ میلی‌گرم از هر ماده (هیدروکسی‌آپاتیت، کوپلیمر و کامپوزیت) در مجاورت سلول‌ها قرار داده شدند.

در روزهای آزمون (۷ و ۱۴) محیط تخلیه و چاهک‌ها دوبار با PBS شسته شدند. سپس محلول MTT اضافه گردید و پلیت در انکوباتور سلولی در دمای ۳۷ درجه به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. طی این زمان، سلول‌ها بسته به توان زیستی به احیاء محلول MTT به فورمازان پرداختند سپس محلول خارج شد و بدون شست چاهک‌ها، DMSO جهت حل کریستال‌های تشکیل‌شده اضافه گردید. پس از ۱۵ دقیقه، پلیت‌ها در دستگاه الیزاریدر قرار داده شد و میزان OD در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید.

آزمون زیست‌فعالی (فعالیت آلکان فسفاتاز)

در این آزمون که برای سنجش فعالیت بالقوه استخوان‌سازی به کار می‌رود، از سلول‌های استئوبلاست MG۶۳ استفاده گردید و تست زیست‌فعالی در روزهای ۷ و ۱۴ انجام شد.

پس از کشت اولیه سلول‌ها و پاساژ دوم، برای هر روز آزمون و هر گروه اصلی تابش لیزر و کنترل در چاهک‌های یک پلیت ۹۶ خانه ۲۰۰۰۰ هزار



شکل ۱

روش تهیه کوپلیمرها

زنجیره‌های پلیمری برای ایجاد پیوندهای استری، در فشار تعادلی در داخل منتل تا ۱۶۰ درجه در حضور کاتالیزور اکسید آنتیموان Sb_2O_3 در حلال زایلین به‌عنوان رفلکس جهت خارج کردن آب واکنش با روش دین‌استارک حرارت دیدند.

در مرحله بعد، کوپلیمرهای تولیدشده اولیه تا رسیدن به جرم مولکولی مطلوب، در حضور کاتالیزور اکتوات قلع و DBTDL (دی‌بوتیل‌تین‌دی‌لورئات) تحت خلأ ۵۰ درصد و دمای ۱۴۰ درجه تحت واکنش قرار داده شدند. این زنجیره‌ها برای تأیید ترکیب شیمیایی تحت آزمون‌های FTIR, NMR قرار گرفتند. بر مبنای آزمایش GPC وزن مولکولی زنجیره مزبور ۲۲,۵۵ KDa برآورد گردید. کوپلیمرها در مولدهای مکعبی به حجم ۸ میلی‌متر مکعب مولد شدند.

روش تهیه کامپوزیت‌ها

پلیمرهای سنتز شده در حلال استونحل شده با محلول‌هیدروکسی‌آپاتیت در پلی‌پروپیلن گلیکول با روش اولتراسونیک به‌صورت یکنواخت و با نسبت وزنی ۲۰ درصد هیدروکسی‌آپاتیت و ۸۰ درصد کوپلیمر مخلوط و دیسپرس شدند، پس از آن که کامپوزیت‌ها در مولدهای مکعبی به حجم ۸ میلی‌متر مکعب مولد شدند، به مدت ۲۴ ساعت تحت خلأ ۰/۵ بار برای

جدول ۲: نتایج آزمون زیست فعالی (فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز)

ماده	روز هفتم		روز چهاردهم	
	بدون تابش لیزر	با تابش لیزر	بدون تابش لیزر	با تابش لیزر
هیدروکسی آپاتیت	۰/۳۶±۰/۰۱	۰/۲۴±۰/۰۱	۰/۴۷±۰/۰۴	۰/۴۵±۰/۰۲
کوپلیمر	۰/۲۲±۰/۰۰۷	۰/۳۱±۰/۰۰۵	۰/۲۸±۰/۰۱	۰/۲۵±۰/۰۴
کامپوزیت	۰/۲۳±۰/۰۰۳	۰/۲۲±۰/۰۰۳	۰/۳۴±۰/۰۱	۰/۳۹±۰/۰۰۳
کنترل	۰/۲۵±۰/۰۰۵	۰/۲۸±۰/۰۰۶		
کنترل لیزر	۰/۲۸±۰/۰۰۱		۰/۳۳±۰/۰۰۴	

بیواکتیویته بیشتری دارند و باعث افزایش آنزیم آلکالین فسفاتاز می شوند و این میزان طی زمان افزایش می یابد هر دو این روندها دارای تفاوت معنی دار می باشند.

اثر لیزر بر زیست فعالی یا بیواکتیویته هیدروکسی آپاتیت در هر دوزمان اندازه گیری معنی دار نیست و باعث افزایش آن نمی شود.

این اثر بر کوپلیمر مورد آزمایش نیز به طور کلی معنی دار نیست در خصوص کامپوزیت هم می توان گفت که تابش لیزر باعث افزایش اندک زیست فعالی در روز چهاردهم می گردد ولی این تغییر مختصر معنی دار نمی باشد.

بررسی اثر لیزر به تنهایی نیز بیانگر عدم تفاوت معنی دار در افزایش بیواکتیویته سلول ها و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در گروه تابش لیزر می باشد.

بحث

بر مبنای نتایج این تحقیق زیست سازگاری هیدروکسی آپاتیت نسبت به کامپوزیت و کوپلیمر در سطح بالاتری قرار دارد و اصولاً این نتیجه در مطالعات بی شماری مورد تأکید قرار گرفته است.

زیست سازگاری پلیمرهای زیست تخریب پذیر به دلیل ماهیت اسیدی خود و نیز هیدرولیز به ترکیبات سازنده کمتر از گروه بیو-سرامیک ها است. در خصوص کامپوزیت ها وجود سهمی از هیدروکسی آپاتیت از یکسو موجب ارتقاء زیست سازگاری نسبت به پلیمرها می شود و از سوی دیگر اثر بافرکنندگی هیدروکسی آپاتیت موجب می شود این اثر بهبودیابد.

میزان زیست سازگاری این محصولات طی زمان افزایش می یابد. هر دوی این روندها دارای تفاوت معنی دار می باشند. این اثر را می توان به تعامل مثبت این مواد به عنوان مواد زیست سازگار با سلول ها نسبت داد.

در خصوص تابش لیزر و اثر آن نتایج مطالعه حاضر نشان می دهند که اثر لیزر بر زیست سازگاری هیدروکسی آپاتیت در هر دوزمان اندازه گیری معنی دار است و باعث افزایش آن می شود. یعنی تابش لیزر

عدد سلول در ۱۰۰ میکرولیتر محیط DMEM کشت داده شدند. هر گروه ۵ چاهک پس از ۲۴ ساعت ۵ میلی گرم از هر ماده (هیدروکسی آپاتیت، کوپلیمر و کامپوزیت) در مجاورت سلول ها قرار داده شدند.

در روزهای آزمون (۷ و ۱۴) محیط تخلیه و چاهک ها دوبار با PBS شسته شدند. سپس محلول Lysis buffer حاوی 1.5M Tris-HCl (pH 9) و 0.5M MgCl₂-6H₂O و 0.2% Triton X-100 بود، اضافه گردید و به مدت ۳۰ ثانیه سونیکیت شد، سپس محلول PNPP بافر شده در دی اتانول آمین اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. در نهایت محلول ۱ نرمال هیدروکسید سدیم جهت اتمام واکنش اضافه گردید. میزان OD در دستگاه الیزا ریدر در ۴۰۵ نانومتر قرائت گردید.

آزمون آماری

نتایج بررسی با آزمون ANOVA در نرم افزار SPSS مورد بررسی قرار گرفت و P.value کمتر از ۵ درصد در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج آزمون زیست سازگاری در جدول ۱ منعکس شده است.

جدول ۱: نتایج آزمون زیست سازگاری

ماده	روز هفتم		روز چهاردهم	
	بدون تابش لیزر	با تابش لیزر	بدون تابش لیزر	با تابش لیزر
هیدروکسی آپاتیت	۰/۷۸±۰/۰۵	۰/۸۹±۰/۰۱	۱/۱۹±۰/۱۹	۱/۴۵±۰/۲
کوپلیمر	۰/۲۸±۰/۰۰۳	۰/۲۶±۰/۰۰۲	۰/۳۲±۰/۰۰۳	۰/۴۴±۰/۰۰۳
کامپوزیت	۰/۴۶±۰/۰۰۱	۰/۵۷±۰/۰۰۱	۰/۴۷±۰/۰۰۲	۰/۵۹±۰/۰۰۲
کنترل	۰/۹۶±۰/۰۰۵	۱/۱۱±۰/۱۴		
کنترل لیزر	۰/۸۴±۰/۰۰۶		۰/۹۲±۰/۰۰۵	

همان گونه که از جدول نتایج قابل استخراج است، به ترتیب بلور هیدروکسی آپاتیت نسبت به کامپوزیت و کوپلیمر زیست سازگاری بیشتری دارد و این میزان طی زمان افزایش می یابد هر دو این روندها دارای تفاوت معنی دار می باشند. اثر لیزر بر زیست سازگاری هیدروکسی آپاتیت در هر دوزمان اندازه گیری معنی دار است و باعث افزایش آن می شود. این اثر بر کوپلیمر مورد آزمایش به طور کلی معنی دار نیست در خصوص کامپوزیت هم می توان گفت که تابش لیزر باعث افزایش اندک زیست سازگاری می گردد و این تغییر مختصر معنی دار است. بررسی اثر لیزر به تنهایی نیز بیانگر عدم تفاوت معنی دار در افزایش viability سلول ها در گروه تابش لیزر می باشد. نتایج آزمون زیست فعالی (آنزیم آلکالین فسفاتاز) در جدول ۲ منعکس شده است.

همان گونه که از جدول نتایج قابل استخراج است، به ترتیب بلور هیدروکسی آپاتیت نسبت به کامپوزیت و کوپلیمر زیست فعالی یا

نتیجه‌گیری

تابش دوز و طول‌موج لیزر مورد آزمون در این مطالعه می‌تواند موجب بهبود زیست‌سازگاری هیدروکسی‌آپاتیت و کامپوزیت شود ولی بر کوپلیمر بی‌اثر است. همچنین این تابش بر بیواکتیویته و میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز سلول‌ها در مجاورت مواد مورد آزمون بی‌تأثیر بوده است.

باعث بهبود وایابیلیته سلول‌ها در کنار هیدروکسی‌آپاتیت می‌شود. این اثر طبعاً با دوز و طول‌موج لیزر ارتباط دارد زیرا برخی مطالعات مشابه با دوزهای متفاوت و طول‌موج‌های متفاوت به نتایج متنوعی رسیده‌اند که از تأثیر منفی تا مثبت متغیر است.

این اثر بر کوپلیمر مورد آزمایش به‌طور کلی معنی‌دار نیست در خصوص کامپوزیت هم می‌توان گفت که تابش لیزر باعث افزایش اندک زیست‌سازگاری می‌گردد و این تغییر مختصر معنی‌دار است در خصوص کامپوزیت این اثر به سهم هیدروکسی‌آپاتیت و فعالیت آن تحت تابش لیزر در کنار سلول برمی‌گردد.

بررسی اثر لیزر به‌تنهایی نیز بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در افزایش *viability* سلول‌ها در گروه تابش لیزر می‌باشد که با دوز و طول‌موج لیزر ارتباط دارد و آن اثر البته باعث سهولت تفکیک اثر توأم مجاورت مواد مورد آزمون و لیزر کم‌توان می‌شود.

در خصوص بیواکتیویته می‌توان گفت که به ترتیب بلور هیدروکسی‌آپاتیت نسبت به کامپوزیت و کوپلیمر زیست‌فعالی یا بیواکتیویته بیشتری دارند و باعث افزایش آنزیمی آلکالین فسفاتاز می‌شوند و این میزان طی زمان افزایش می‌یابد هر دو این روندها دارای تفاوت معنی‌داری باشند.

توانایی هیدروکسی‌آپاتیت در افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز به دلیل ماهیت استئوکاندکتیو آن مورد تأکید قرار گرفته است و طی زمان نیز افزایش می‌یابد. اثر لیزر بر زیست‌فعالی یا بیواکتیویته هیدروکسی‌آپاتیت در هر دوزمان اندازه‌گیری معنی‌دار نیست و باعث افزایش آن نمی‌شود. ماهیت پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر فاقد توانایی القاء فعالیت‌های استخوان‌سازی است و لذا این دسته در مواد مورد آزمایش دارای حداقل توانایی افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز هستند و میزان مختصر زیست‌فعالی کامپوزیت‌ها نیز به دلیل حضور هیدروکسی‌آپاتیت است.

در خصوص اثر لیزر، این اثر بر کوپلیمر مورد آزمایش نیز به‌طور کلی معنی‌دار نیست در خصوص کامپوزیت هم می‌توان گفت که تابش لیزر باعث افزایش اندک زیست‌فعالی در روز چهاردهم می‌گردد ولی این تغییر مختصر معنی‌دار نمی‌باشد. این مطلب علاوه بر وابستگی به دوز و طول موج لیزر می‌تواند به دلیل ماهیت استئوبلاستیک سلول‌های مورد استفاده باشد.

بررسی اثر لیزر به‌تنهایی نیز بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در افزایش بیواکتیویته سلول‌ها و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در گروه تابش لیزر می‌باشد. که خود موجب تفکیک اثر لیزر در مجاورت مواد از اثر مستقیم بر سلول‌ها است.

References:

1. deMendonca Costa AM, Bueno DF, Kerkis I. Reconstruction of large cranial defects in non-immunosuppressed rats with human stem cells: A preliminary report. *J Craniofac Surg* 2008;19(1):204–10.
2. Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M, Benayahu D, Robey PG. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res* 1997;12:1335–47.
3. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13625–30.
4. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279–95.
5. Gargett CE. Identification and characterisation of human endometrial stem/progenitor cells. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2006; 46:250–3.
6. Long MW. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. *Blood Cell Mol Dis*. 2001; 27:677–90.
7. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J. Dent. Res*. 2002; 81: 531–5.
8. TerBrugge PJ, Jansen JA. In vitro osteogenic differentiation of rat bone marrow cells subcultured with and without dexamethasone. *Tissue Eng* 2002; 8:321–31.
9. Donofrio G, Franceschi V, Capocefalo A, Cavarani S, Sheldon I. M. Bovine endometrial stromal cells display osteogenic properties. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2008; 6:65.
10. Woodruff LD, Bounkeo JM, Brannon WM. The efficacy of laser therapy in wound repair: A meta-analysis of the literature. *Photomed Laser Surg* 2004; 22(3):241–7.
11. Mester E, Nagylucskay S, Tisza S, Mester A. Stimulation of wound healing by means of laser rays. *Acta Chir Acad Sci Hung* 1978; 19:163–70.
12. Kana JS, Hutschenreiter G, Haina D, Waidelich W. Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wound in rats. *Arch Surg* 1981; 116:293–6.
13. Lam TS, Abergel RP, Meeker CA, Castel JC, Dwyer RM, Uitto J. Laser stimulation of collagen synthesis in human skin fibroblast cultures. *Lasers Life Sci* 1986; 1:61–77.
14. Anders JJ, Borke RC, Woolery SK, Van de Merwe WP. Low power laser irradiation alters the rate of regeneration of the rat facial nerve. *Lasers Surg Med* 1993; 13:72–82.
15. Karu T. Laser biostimulation: A photobiological phenomenon. *J Photochem Photobiol B* 1989;3:638–40.
16. Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys* 1989;56:691–704.
17. Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg* 2005;23:161–6.
18. Ozawa Y, Shimizu N, Mishima H, Kariya G, Yamaguchi M, Takiguchi H, Iwasawa T, Abiko Y. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone formation in vitro. In: Altshuler GB, Blankenau RJ, Wigdor HA (eds) *Advanced Laser Dentistry*. Proc SPIE 1984. International Society for Optical Engineering, Washington, DC, 1995; 281–8.
19. Dortbudak O, Haas R, Mailath-Pokorny G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin Oral Implants Res* 2000; 11:540–5.
20. Abbott A. Biology's new dimension. *Nature* 2003; 424:870–72.
21. Gelinsky M, Welzel PB, Simon P. Porous three-dimensional scaffolds made of mineralized collagen: preparation and properties of a biomimetic nanocomposite material for tissue engineering of bone. *Chem Eng J* 2008; 137:84–96.
22. Eyrich D, Brandl F, Appel B, Wiese H, Maier G, Wenzel M, Staudenmaier R, Goepferich A, Blunk T. Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials* 2007; 28(1): 55–65.

23. Linnes MP, Ratner BD, Giachelli CM. A fibrinogen-based precision microporous scaffold for tissue engineering. *Biomaterials* 2007; 28(35): 5298–306.
24. Ueda Y, Shimizu N. Effects of pulse frequency of low level laser therapy (LLLT) on bone nodule formation in rat calvarial cells. *J Clin Laser Med Surg* 2003; 21:271–7.
25. Trelles MA, Mayayo E. Bone fracture consolidates faster with low power laser. *Lasers Surg Med* 1987; 7:36–45.
26. Lunger EJ, Rochkind S, Wollman Y, Kogan G, Dekel S. Effect of low power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. *Lasers Surg Med* 1998; 22:97–102.
27. Barushka O, Yaakobi T, Oron U. Effect of low-energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia. *Bone* 1995; 16:47–55.
28. Kawasaki K, Shimizu N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. *Lasers Surg Med* 2000; 26:282–91.
29. Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg* 2005; 23(2):161–66.
30. Stadler I, Evans R, Kolb B, Naim JO, Narayan V, Buehner N, Lanzafame RJ. In vitro effects of low-level laser irradiation at 660 nm on peripheral blood lymphocytes. *Lasers Med Sci* 2000; 3:255–61.
31. Jia YL, Guo ZY. Effect of low power He-Ne laser irradiation on rabbit articular chondrocytes in vitro. *Laser Surg Med* 2004; 34:323–8.
32. Van Breugel HH, Bar PR. He-Ne laser irradiation affects proliferation of cultured rat Schwann cells in a dose dependent manner. *J Neurocytol* 1993; 22(3):185–90.
33. Pourzarandian A, Watanabe H, Ruwanpura S, Aoki A, Ishikawa I. Effect of low level Er:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2005; 76:187–93.
34. Mie M, Ohgushi H, Yanagida Y, Haruyama T, Kobatake E, Aizawa M. Osteogenesis coordinated in C3H10T1/2 cells by adipogenesis-dependent BMP-2 expression system. *Tissue Eng* 2000; 6:9–18.
35. Chen D, Ji X, Harris MA, Feng JQ, Karsenty G, Celeste AJ, Rosen V, Mundy GR, Harris SE. Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. *J Cell Biol* 1998; 142:295–305.
36. Thompson DL, Lum KD, Nygaard SC, Kuestner RE, Kelly KA, Gimble JM, Moore EE. The derivation and characterization of stromal cell lines from the bone marrow of p53(-/-) mice: New insights into osteoblast and adipocyte differentiation. *J Bone Miner Res* 1998; 13:195–204.
37. Liat Abramovitch-Gottlieb, Talia Gross Doron Naveh, Shimona Geresh, Salman Rosenwak, Ilana Bar, Razi Vago. Low level laser irradiation stimulates osteogenic phenotype of mesenchymal stem cells seeded on a three-dimensional biomatrix. *Lasers in Medical Science* 2005; 20: 138–46.